Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin
(Vorstand: Prof. Dr. Zeiss)
(Abteilung: Prof. Dr. Pesch)

Ueber den Einfluß fettlöslicher Vitamine auf das Wachstum von Tuberkelbakterien in flüssigen synthetischen Nährlösungen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades an der
Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

Vorgelegt von

Marianne Meißner geb. Jahn
aus Brandenburg/Havel

Tag der Promotion: 30. Juli 1941

Druck: Karl und Richard Hoffmann, Charlottenburg, Schillerstr. 44

M 193

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Kreuz
Referent: Prof. Dr. Pesch
Korreferent: Prof. Dr. Habs

R. UNIV
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die Tatsache, daß es nur dann möglich ist, in Auswurfproben oder in einem anderen Untersuchungsmaterial mit Hilfe der Ziehl-Neelsen-Färbung Tuberkelbakterien (TbB) mikroskopisch nachzuweisen, wenn diese in größerer Zahl vorhanden sind, läßt die Bedeutung des kulturellen Nachweises einzelner Tuberkelbakterien im Rahmen der ärztlich-klinischen Tuberkulosediagnostik klar erkennen. — So ist es auch verständlich, daß schon Robert Koch den Versuch unternommen hat, TbB auf Glyzerinagar, in Glyzerinbouillon oder auf erstarrtem Rinder- oder Schafserum zur Vermehrung zu bringen. Seine kulturellen Erfolge waren jedoch noch nicht derart, daß von einer Brauchbarkeit dieser Methode für die klinisch-ärztliche Tuberkulosediagnostik gesprochen werden konnte. Erst die Einführung der Eiernährböden, die in vielen Modifikationen angegeben und immer wieder verbessert wurden (Dorset, Lubenau, Petroff, Petragnani, Hohn u. a.) haben, in Kombination mit der Säurevorbehandlung des Untersuchungsmaterials, zu einem wirklich brauchbaren Verfahren der Tuberkelbakterienzüchtung geführt. Es darf aber nicht übersehen werden, daß auch dieser Methode (jetzt wohl allgemein als das „Hohn'sche Verfahren" bezeichnet) noch recht erhebliche Mängel anhaften. Es sind dies:

1. Schwierigkeiten in der Beschaffung des für die Herstellung der Nährböden erforderlichen Materials (Eier); dies gilt besonders für Zeiten der Nahrungsmittelknappheit.
2. Die Möglichkeit der Nährbodenverunreinigung. Hier handelt es sich entweder um Keime, die aus den Nährbodenbestandteilen (Eiern) stammen oder um besonders resistente sporenbildende Mikroben, die bei der Säurevorbehandlung des Untersuchungsmaterials (Sputum, Milch, Kot usw.) nicht abgetötet wurden. —

3. Lange Dauer bis zum Angehen der Kulturen; besonders die bovinen Tuberkelbakterien benötigen bis zum Sichtbarwerden des Wachstums auf den Eiernährböden oft 10—12 Wochen oder auch noch mehr.
4. Auch bei sorgfältigster Durchführung der Züchtungsmethode gehen Kulturen gelegentlich nicht an, trotzdem in dem verimpften Material lebende virulente TbB vorhanden waren (Nachweis durch den Tierversuch).

Diese Schwierigkeiten bei der Züchtung von Tuberkelbakterien auf Eiernährböden machen es verständlich, daß man immer wieder versuchte. Die Methodik der TbB-Kultur zu vereinfachen und zu verbessern. —

Wenn man nun sieht, wie TbB auf den an Nährstoffen doch so reichen Eiernährböden viele Wochen bis zum Angehen der Kulturen benötigen und hier und da überhaupt nicht wachsen, so könnte man vielleicht zu der Meinung kommen, daß TbB in ihren Nährbödenanforderungen besonders anspruchsvoll sind. Dies ist aber sicher nicht der Fall; denn wir wissen ja schon seit langem, daß TbB auch in nährstoffarmen synthetischen Nährlösungen sich recht gut zu vermehren vermögen. Kühne, Proskauer und Beck, Sauton, Lockemann und viele andere haben gezeigt, daß der Weg der Züchtung von TbB auf Mineralsalzlösungen mit einer einfachen N- und einer einfachen C-Quelle durchaus erfolgreich beschritten werden kann. Auf allen diesen flüssigen Nährböden (und das gilt auch für die Züchtungsversuche von R. Koch auf Glyzerinbouillon) wachsen nun die hineingeimpften TbB meist nicht diffus, d. h. in der Tiefe des Nährbodens, wie wir es sonst beim Wachstum von Mikroben in flüssigen Medien ganz allgemein zu beobachten gewohnt sind, sondern nur auf der Oberfläche des Kulturbodens in Form eines feinen Häutchens, das dann im Laufe der weiteren Bebrütung an Umfang und Dicke mehr und mehr zunimmt. Diese Art des Wachstums, die z. B. für die Tuberkulingewinnung wesentlich ist, macht jedoch eine solche flüssige TbB-Kultur für bestimmte

Zwecke unbrauchbar, so z. B. für die Gewinnung von gleichmäßigen TbB-Aufschwemmungen für Agglutinationsversuche, für die Prüfung von Desinfektionsmitteln oder für die Auswertung eines neuen chemotherapeutischen Präparates.

Ausgehend von den Arbeiten von Lockemann über die Züchtung von TbB in synthetischer Nährlösung mit Monokaliumphosphat, Mononatriumphosphat, Magnesiumsulfat, Natriumcitrat, Asparagin und Glyzerin versuchte O. Kirchner durch Aenderung in der Zusammensetzung dieses Nährbodens zu günstigeren Wachstumsbefunden (schnelleres und regelmäßigeres Wachstum), gleichzeitig aber auch zu einer gleichmäßigen Vermehrung der TbB in der Tiefe des Nährbodens zu gelangen. In 3 verschiedenen Nährbodenkombinationen (10 % Serumzusatz; Wechsel von Asparagin und Glyzerin) erzielte K. mit seinen „Tiefenkulturen" bemerkenswerte Ergebnisse, die den bisherigen kulturellen Befunden auf Eiernährböden im allgemeinen wohl nicht nachstehen. Dies gilt sowohl hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit als auch hinsichtlich der Zahl der positiven Kulturen, auch bei der Verarbeitung TbB-armen Materials. Trotzdem ist nicht zu leugnen, daß auch die von K. angegebene kulturelle Methode noch durchaus der Verbesserung bedarf.

Abdul Rahim versuchte nun, angeregt durch die Arbeit von O. Kirchner (mitgeteilt in einer aus dem Hyg. Institut der Universität Berlin erschienenen Dr.-Diss.) durch Aenderung des von K. angegebenen Nährbodens zu einer Verbesserung dieses ohne Zweifel aussichtsreichen Verfahrens zu kommen. Rahim ging zunächst von der Beobachtung aus, daß TbB auf Glyzerinkartoffeln recht gut wachsen (was zuerst von Pavlowsky gezeigt wurde) und setzte dementsprechend den Kirchnerschen Nährböden 0,5 % Kartoffelmehl zu. Die zweite Aenderung der Nährbodenzusammensetzung, die R. vornahm, bestand in einem Zusatz der wasserlöslichen Vitamine B_1, B_2 und C (in Form von Priovit). Die Frage ob ein solcher Zusatz im Sinne einer

echten Vitaminwirkung in Bakterienkulturen vermehrungsaktivierend sich auszuwirken vermag oder ob die zugesetzten Stoffe und ihre Lösungsmittel nur als Nährstoffe und Energiequellen im Verwendungsstoffwechsel der Mikroben ausgenutzt werden (das gilt auch für die in dieser Arbeit zu besprechenden Versuche mit den fettlöslichen Vitaminen A und D) soll hier unbeantwortet bleiben. Daß solche akzessorischen Nährstoffe im Rahmen der mikrobakteriellen Umsetzungen zum mindesten bei einzelnen Bakterienarten von großer Bedeutung sein können, kann auf Grund zahlreicher bakteriologischer Veröffentlichungen gerade der letzten Zeit wohl nicht mehr zweifelhaft sein, es sei hier nur an die experimentell sichergestellte Wirkung der Askorbinsäure für das Wachstum anaerober Bakterien erinnert (ältere Literatur im Handb. d. pathолog. Mikroorg. III. Aufl. Bd. I, S. 137 f.)

Betrachtet man die Ergebnisse der Rahimschen Arbeit in ihrer Gesamtheit, so kann man feststellen, daß seine Befunde im ganzen ziemlich uneinheitlich sind. Recht günstigen Befunden stehen auch einzelne deutliche Versager gegenüber, wobei die Gründe für das fehlende Wachstum der TbB im einzelnen nicht zu erkennen sind. Die Vermutung, daß diese wechselnden Ergebnisse vielleicht darauf zurückzuführen sind, daß Typ. humanus und Typ. bovinus in solchen Nährlösungen differente Wachstums-Kurven zeigen (was besonders auf Grund der Arbeit von Strehl (Dr.-Diss. Berlin 1940) über die Typenbestimmung von TbB auf synthetischen Agarnährböden angenommen werden könnte) dürfte nicht richtig sein, da es sich in der Arbeit von R. ja ausschließlich um die Verarbeitung von tuberkulösen Sputen handelt, bei denen der bovine TbB-Typ ja praktisch keine Rolle spielt. Trotzdem sind die Gesamtbefunde der Rahimschen Veröffentlichung wie auch der Arbeit von O. Kirchner so ermutigend, daß eine Fortführung dieser kulturellen Methode durchaus aussichtsreich erscheint.—

Berücksichtigt man den mikrochemischen Bau der Tb-Bakterienzelle, so ergibt sich ohne weiteres die Frage, ob nicht durch die Zugabe von Fetten und fettlöslichen Vitaminen (A, D) zu solchen synthetischen Nährlösungen wie sie O. Kirchner angegeben hat, eine Begünstigung des Wachstums von TbB erreicht werden kann.—

Die Schwierigkeit, die es bei der Gewinnung solcher A und D-vitaminhaltiger Nährböden zunächst zu überwinden galt, war die Herstellung einer gleichmäßig feinen und stabilen Emulsion, in der auch nach wochenlanger Bebrütung und auch unter dem Einfluß der aus der Vermehrung der TbB sich ergebenden Aenderungen der Nährbodenzusammensetzung (z. B. Wechsel des ph-Wertes) ein Entmischungsvorgang nicht zu befürchten war. — Lecitin und Tragant bewährten sich uns dabei nicht, da schon nach 8 Tagen eine Trennung der beiden Phasen zustande kam. Schließlich gelang es uns mit dem Emulgator „Etona" (Firma: Gehe & Co., Dresden) eine auch noch nach vielen Wochen völlig stabile Emulsion zu erzielen.

Als Vitaminträger benutzten wir:

1.) Lebertran
2.) Das Präparat Vogan (A-Vitamin)
3.) Das Präparat Vigantol (D-Vitamin)
4.) Das Präparat Detavit (A u. D-Vitamin)
5.) Mohrrübensaft (A + B_1 + B_2 + C-Vitamin)

Diese Vitaminträger wurden dem Nährboden zugesetzt so wie ihn O. Kirchner angegeben hat (mit 10 % Serum, 2 % Glyzerin, 0,5 % Asparagin), wobei wir auf Grund der Rahimschen Befunde noch 0,5 % Kartoffelmehl zufügten. —

Die Zubereitung der Nährböden erfolgte in mehreren Arbeitsgängen.

A.) Es wurde eine Stammlösung von folgender Zusammensetzung hergestellt:

Dinatriumphosphat	3,0
Monokaliumphosphat	4,0

Magnesiumsulphat	0,6
Natriumcitrat	2,5
Asparagin	5,0
Kartoffelmehl	5,0
Glyzerin	20,0
Aqu. dest.	1000,0

Die einzelnen Zutaten wurden nach genauestem Abwiegen in einem Erlenmeyer-Kolben zusammengeschüttet und mit dem Aqua destillata aufgelöst.

Die Wasserstoffionenkonzentration der Nährböden wurde mit Natriumbikarbonat und Eisessig eingestellt und verschiedentlich variiert. Es erwies sich, daß ein ph zwischen 6,4 und 6,6 am günstigsten für das Wachstum der Stäbchen war. Bei einem ph über 7 und unter 6 war das Wachstum deutlich gehemmt.—

Diese fertige Stammlösung wurde bei 120 Grad 1 Stunde lang sterilisiert, wobei auch das Kartoffelmehl restlos in Lösung ging. Die Lösung wurde im Eisschrank stets vorrätig gehalten.—

B) Der Zusatz der einzelnen Vitaminträger geschah in folgender Weise:

1. Lebertran:

Wir emulgierten 10 ccm Lebertran mit einer Messerspitze „Etona" und fügten dieser Emulsion unter ständigem Rühren 250 ccm Stammlösung hinzu. Diese Lösung wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine halbe Stunde lang auf 60 Grad C erhitzt. — Später wurden statt 10 ccm Lebertran nur 5 ccm auf 250 ccm Stammlösung verwandt, da sich zeigte, daß das Wachstum der TbB bei geringen Mengen Lebertran ein besseres war. —

2. Detavit „Merck",

Das Merck'sche Detavit wird als Emulsion geliefert. Auf 250 ccm Stammlösung kamen 5 ccm Detavit. — Diese Lösung wurde in gleicher Weise sterilisiert, wie die Lebertranlösung.

3. Vogan und Vigantol.

Einer dritten Nährlösung wurden 3 Dragées Vigantol und 3 Dragées Vogan (Bayer) auf 250 ccm Stammlösung hinzugefügt. Auch diese Lösung wurde vor Hinzufügen des Serums an drei Tagen hintereinander auf 60 Grad C eine halbe Stunde lang erhitzt.

4. Mohrrübensaft.

Schließlich stellten wir noch eine Lösung mit Mohrrübensaft her. Es wurde dabei von dem Gedanken ausgegangen, daß das Carotin eine Vorstufe des Vitamin A sei, und der Mohrrübensaft außerdem noch wasserlösliche Vitamine enthält. — Hierzu wurden die Mohrrüben geschabt, und der daraus gewonnene Preßsaft mit der zehnfachen Menge Aqu. dest. verdünnt. Diese Lösung wurde, um sie bakterienfrei zu machen, durch Asbestfilter der Firma Seitz geschickt und steril der Stammlösung hinzugefügt. Auf 250 ccm Stammlösung kamen 100 ccm Mohrrübensaft. —

C) Das Serum wurde uns steril gewonnen geliefert und unter sterilen Verhältnissen der Stammlösung zugesetzt. Wir überzeugten uns von der Sterilität des Serums, indem wir etwas Serum auf eine Agar-Platte übertrugen und diese 24 Stunden bei 37° C im Brutschrank hielten. Auf 250 ccm Stammlösung kamen 25 ccm Rinderserum.

Es standen uns nun also 4 verschiedene Nährböden zur Verfügung:

A. 250 ccm Stammlösung
   5 ccm Lebertranemulsion mit einer Messerspitze „Etona".
   25 ccm frisches Rinderserum
B. 250 ccm Stammlösung
   5 ccm Detavit
   25 ccm frisches Rinderserum
C. 250 ccm Stammlösung
   3 Dragées Vogan

3 Dragées Vigantol
25 ccm frisches Rinderserum
D. 250 ccm Stammlösung
100 ccm Mohrrübensaft 1 : 10
25 ccm frisches Rinderserum

D.) Die so fertiggestellten und keimfrei gemachten Nährböden wurden unter sterilen Voraussetzungen auf Reagenzröhrchen von 16 mm lichter Weite gefüllt, in jedes Röhrchen 5 ccm. —

Ein Nachteil unserer Nährböden liegt darin, daß sie sich schwer von Sporen frei halten lassen. So haben wir zweimal im Laufe unserer Versuche eine Serie von 50 Röhrchen fortwerfen müssen. — Trotzdem haben wir auf Zusätze, die zum Eindämmen des Sporenwachstums dienen, wie Malachitgrün und Genziana-Violett, verzichtet, da diese erfahrungsgemäß auch das Wachstum der Tuberkelbazillen hemmen. Später ist es uns durch Uebung und Sorgfalt auch immer gelungen, Nährbodenverunreinigung zu vermeiden.

Als Impfmaterial wurden Sputen verwandt, die uns die Untersuchungsstation des Hyg. Institutes zur Verfügung stellte. Von jedem Sputum wurden zwei Ausstriche gemacht, und der eine nach der Methode von Ehrlich-Ziehl-Neelsen, der andere mit Auramin nach der Methode von W. Herrmann gefärbt. Beide Ausstriche wurden vergleichsweise auf Tuberkelbazillen untersucht.

Die zu verimpfenden Sputen wurden zunächst mit 8 vol% Schwefelsäure versetzt (5 ccm H_2SO_4 auf 2 ccm Sputum) und eine halbe Stunde unter öfterem Umschütteln stehen gelassen. — Dann wurden die Sputen 15 Minuten lang zentrifugiert, abgegossen und der Bodensatz mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gut ausgeschüttelt, noch einmal 15 Minuten zentrifugiert und abgegossen.

Der Bodensatz wurde mit der Oese verimpft und zwar in der Weise, daß jedes Sputum gleichmäßig auf alle 4

Nährböden verteilt wurde. Von jeder Nährbodenreihe wurden je 4 Röhrchen mit dem gleichen Sputum beimpft. Die Bebrütung erfolgte in Wärmeschränken, die auf eine konstante Temperatur von 37° C eingestellt waren. —

Für den mikroskopischen Nachweis von Tuberkelbakterien benutzten wir neben der Ziehl-Neelsen-Färbung auch die fluorescenzmikroskopische Darstellung nach P. Hagemann und zwar in der von W. Herrmann angegebenen Modifikation:

1. Hitzefixieren des Präparates.
2. Uebergießen mit Auramin und erhitzen bis Dämpfe aufsteigen, 5 Minuten stehen lassen.
3. Abspülen mit fließendem Leitungswasser.
4. Differenzieren mit Salzsäure-Alkohol 20 Sekunden.
5. Abspülen mit Leitungswasser.
6. Eintauchen 5 Sekunden lang in Kalium permanganat-Lösung 1:1000.
7. Abspülen mit Leitungswasser.
8. Eintauchen 1 Sekunde in Methylenblau.
9. Abspülen mit Leitungswasser.
10. Trocknen zwischen Fließpapier.

Wie heute wohl allgemein anerkannt wird, ist es durch dieses Verfahren möglich geworden, auf fluorescenzmikroskopischem Wege auch vereinzelte TbB, die im Ziehl-Neelsen-Präparat der Darstellung entgehen, nachzuweisen. Von den zahlreichen Arbeiten, die sich mit dieser Frage beschäftigen, seien hier nur die Veröffentlichungen von Rheza-Nouir, Abdul Rahim, W. Jung. Strehl, Teubert aus dem Berliner Hygienischen Institut genannt, aus denen die überragende Bedeutung der Fluorescenzmikroskopie für die bakterioskopische Tuberkulosediagnostik klar und eindeutig hervorgeht.

Auch bei der mikroskopischen Durchmusterung der angelegten Kulturen zeigte sich uns immer wieder die Ueberlegenheit des fluorescenzmikroskopischen Verfahrens über das Ziehl-Neelsen-Präparat.

I. Versuchsreihe:

Um die Brauchbarkeit unserer 4 Nährböden zu erproben, wählten wir zunächst 34 Sputen aus, die sowohl nach Ehrlich-Ziehl-Neelsen, als auch im Fluorescenzmikroskop reichlich Tuberkelbazillen zeigten.

Bereits nach 8 Tagen zeigte sich in den Nährböden B. und D. ein Wachstum von Tuberkelbazillen in der Art, wie O. Kirchner es für seine synthetische Nährlösung angegeben hat: Es bildeten sich kleine graugelbe Kügelchen am Boden des Reagenzglases, die, obwohl unsere Nährböden durch den Kartoffelmehlzusatz einen geringen Bodensatz zeigten, deutlich zu sehen waren. Von jedem Sputum und jedem Nährboden wurde nun je ein Röhrchen zentrifugiert, der Bodensatz wurde ausgestrichen und mit Auramin nach der Methode von Herrmann gefärbt.

Im Fluorescenzmikroskop zeigten dann diese Präparate von den Nährböden B. und D. reichliche in kleinen Häufchen liegende Tuberkelbazillen. Der Ausstrich des Nährbodens C, der makroskopisch kein Wachstum zeigte, wies ebenfalls zahlreiche aber verstreut liegende Stäbchen auf, während die Präparate des Nahrbodens A. nur an vereinzelten Stellen 4—5 Stäbchen im Gesichtsfeld zeigten.

Nach weiteren 8 Tagen fand sich in B. und D. bei sämtlichen 15 Sputen ein üppiges Wachstum von Tuberkelbazillen. Die Bakterienhaufen sahen makroskopisch nicht mehr graugelb und kugelig aus, sondern bildeten Häutchen, die an feinen hellgelben Sand erinnerten, zum Teil auch an der Oberfläche der Flüssigkeit schwebten. Mikroskopisch lagen die Tuberkelbazillen in zopf- oder fischzugähnlicher Anordnung. In C. zeigten sich jetzt durchweg die erst erwähnten graugelben Kügelchen, während von A. nur 9 Röhrchen makroskopisch positiv geworden waren.

Am Ende der dritten Woche bemerkten wir ein deutliches Zurückgehen des Wachstums in sämtlichen Nährböden. Der Nährboden A. zeigte z. T. schon keine TbB. mehr.

Nach 4 Wochen wiesen nur noch die am stärksten angegangenen Kulturen der Lösung B. und D. Tuberkelbakterien auf.

	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
Nährboden A.	26 +	29 +	22 +	11 +
Lebertran	8 —	5 —	10 —	23 —
Nährboden B.	34 +	34 +	34 +	34 +
Detavit	—	—	—	—
Nährboden C.	34 +	34 +	28 +	15 +
Vogan/Vigantol	—	—	6 —	19 —
Nährboden D.	34 +	34 +	34 +	34 +
Mohrrübensaft	—	—	—	

Diese eigenartige Wachstumskurve konnten wir auch in den späteren Versuchsreihen wieder bei allen Kulturen beobachten. — Es sei hier auf die Arbeiten von Bail über die M-Konzentration in flüssigen Bakterienkulturen hingewiesen, die mit den eigenen Versuchen in guter Uebereinstimmung stehen.

II. Versuchsreihe:

Die 2. Versuchsreihe sollte zeigen, ob unsere 4 Nährböden auch für Impfmaterial geeignet sind, in dem nur wenige TbB enthalten sind.

Wir wählten zu diesem Zweck 33 Sputen aus, die nur im Fluorescenzmikroskop Tuberkelbakterien aufwiesen, in der Ziehl-Neelsen-Färbung aber negativ waren. — Jedes Sputum wurde wieder auf alle 4 Nährböden verimpft; und zwar wurden mit jedem Sputum je 4 Röhrchen von jedem Nährboden beimpft, in jedes Röhrchen 4 Oesen Impfmaterial. Die Kulturen wurden wöchentlich kontrolliert und bei fehlendem makroskopischem Wachstum zentrifugiert und im Fluorescenzmikroskop nachgesehen.

Hierbei kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
Nährboden A.	8 +	9 +	4 +	—
Lebertran	25 —	24 —	29 —	33 —
Nährboden B.	28 +	29 +	28 +	12 +
Detavit	5 —	4 —	5 —	21 —
Nährboden C.	15 +	20 +	10 +	3 +
Vogan/Vigantol	18 —	13 —	23 —	30 —
Nährboden D.	21 +	27 +	24 +	18 +
Mohrrübensaft	12 —	6 —	9 —	15 —

Es zeigte sich also, daß A. und C. nicht geeignet waren. Am besten für diagnostische Zwecke bewährte sich B., da er bereits nach 8 Tagen gutes Wachstum zeigte, nach 14 Tagen fast in allen Kulturen auch ein sekundäres Oberflächenwachstum aufwies und auch rein zahlenmäßig die besten Ergebnisse brachte. Nach 3 Wochen waren freilich viele Kulturen nur noch mikroskopisch positiv, nach 4 Wochen ein großer Teil mikroskopisch steril.

Der Nährboden D. brachte nicht ganz so gute Resultate. Das Wachstum der in ihm angelegten Kulturen war aber dafür etwas dauerhafter.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der Versuchsreihe II mit denen der Versuchsreihe I, so zeigt sich, daß das Wachstum der Kulturen nicht nur von der Eignung des betreffenden Nährbodens, sondern auch von der Menge der hineingeimpften Keime abhängt.

III. Versuchsreihe:

Um festzustellen, ob sich aus tuberkuloseverdächtigen aber fluorescenzmikroskopisch negativen Sputen noch Tuberkelbazillen züchten lassen, haben wir auf unsere besten Nährböden B., D. und B_2 zweihundertfünf fluorescenznegative Sputen verimpft.

Zur Kontrolle wurde auch noch mit jedem Sputum ein Röhrchen mit Petragnanischem Eiernährboden beimpft. Diese Röhrchen wurden über 6 Wochen beobachtet. Sie blieben sowohl makroskopisch wie mikroskopisch negativ.

Es sei hier auch darauf hingewiesen, daß wir mit unseren Nährböden wohl noch Tuberkelbazillen aus Sputen züchten konnten, die nach der Untersuchungsmethode von Ehrlich-Ziehl-Neelsen negativ waren. Da diese Methode die in den Kliniken heute allgemein gebräuchliche ist, so ist daneben das Kulturverfahren auf Nährböden, die ein schnelles Wachstum zeigen, ein diagnostischer Vorteil. —

In keinem Falle aber haben wir mit unseren Nährböden bessere diagnostische Resultate erzielt, wie mit dem Fluorescenzmikroskop.

Aber auch die bisher gebräuchlichen Eiernährböden zeitigten hier keine besseren Resultate, wie eine Arbeit von Teubert aus dem Hygienischen Institut in Berlin zeigt, der das kulturelle Verfahren auf Eiernährböden und den fluorescenzmikroskopischen TbB-Nachweis einer vergleichenden Untersuchung unterzog. — Die Versuche Teubert's zeigten, daß 138 fluorescenznegative Sputen auch kulturell negativ waren. Von 69 fluorescenzpositiven, aber Ziehl-Neelsen negativen Sputen, waren 60 kulturell positiv, 9 kulturell negativ. —

Die Ergebnisse Teubert's bezüglich der TbB-Kultur auf Eiernährböden kommen also den Ergebnissen auf unseren vitaminhaltigen Nährböden sehr nahe. Diese Tatsache zeigt, daß unsere synthetischen Nährböden ein guter Ersatz für die Eiernährböden sind. Dazu bieten unsere Nährböden, besonders Nährboden „B" aber noch den Vorteil der Zeitersparnis, da schon sehr früh, meist schon nach 8 Tagen, positive Ergebnisse gezeitigt werden, während das Angehen der Kulturen auf Eiernährböden durchweg 4 Wochen benötigt. —

Da, wie schon gesagt wurde, anzunehmen war, daß es sich bei den mit den Sputen verimpften Tuberkelbazillen um den Typus humanus handelte, mußten wir unsere Nährböden noch auf ihre Brauchbarkeit für das Wachstum des Typus bovinus prüfen.

Zu diesem Zweck wurden Organe tuberkulöser Tiere (Lunge, Lymphknoten) fein zermahlen und in gleicher Weise wie die Sputen mit 8 vol% Schwefelsäure und physiologischer Kochsalzlösung vorbehandelt. Wir verimpften im ganzen 20 verschiedene Organe auf die Nährböden A. und B. und zwar 4 Oesen Organbrei auf 1 Röhrchen. Dazu wurde der Nährboden B. noch insofern abgewandelt, indem wir ihm nach den Angaben von Rahim (s. o.) noch wasserlösliches Vitamin B und C in Form einer Tablette Priovit auf 250 ccm Stammlösung hinzufügten (in der Tabelle ist dieser Nährboden als B_2 bezeichnet). Die Ergebnisse wichen von den Sputenkulturen insofern ab, als sich erst nach 12 Tagen makroskopisches Wachstum zeigte (was, da es sich um den bovinen TbB-Typ handelt, ja nicht weiter verwunderlich ist). Um den 16. Tag herum war das Wachstum am üppigsten, um dann wieder zurückzugehen. Die besten Ergebnisse zeigte der Nährboden B_2, doch zeigten auch hier von 20 mit Ehrlich-Ziehl-Neelsen positiven Organen beimpfte Kulturen nur 16 ein deutliches Wachstum.

	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
Nährboden A.	—	10 +	5 +	—
Lebertran	—	10 —	15 —	—
Nährboden B.	—	15 +	12 +	—
Detavit	—	5 —	8 —	—
Nährboden B_2	—	16 +	12 +	—
Detavit/Priovit	—	4 —	8 —	—

Immerhin sind hier auch in den besten Nährböden 4—5 Versager festzustellen, wobei allerdings zu sagen wäre, daß auch auf Eiernährböden der Typus bovinus schwerer zum Wachstum zu bringen ist als der Typus humanus.

Besprechung der Ergebnisse.

Ausgehend von der Arbeit von O. Kirchner über das Tiefenwachstum von TbB in einer durch Serumzusatz verbesserten Lockemann'schen Nährlösung, und unter Erweiterung der Ergebnisse von Abdul Rahim über die Wachstumsbeeinflussung von TbB durch Kartoffelmehl und durch die Vitamine B_1, B_2 und C haben wir versucht, durch Ersatz der wasserlöslichen durch die fettlöslichen Vitamine (A und D) zu einer weiteren Verbesserung der kulturellen Befunde bei der Züchtung von TbB in synthetischen Nährböden zu kommen. Von den geprüften 4 Nährbödenkombinationen bewährte sich uns am besten das Medium mit dem Vitaminpräparat Detavit (A –D Vitamin); ein etwas weniger gutes Wachstum beobachteten wir bei Zusatz von 1 : 10 verdünntem Mohrrübensaft zu unserer Stammlösung.

Ob dieses weniger günstige kulturelle Ergebnis auf das Fehlen des D-Vitamins in diesem Nährboden zurückzuführen ist, bleibe dahingestellt. Die ungünstigsten kulturellen Ergebnisse erhielten wir mit den Nährböden mit Lebetran, Vogan und Vigantol.

Bei der vierwöchigen Bebrütung unserer Kulturen machten wir ganz allgemein die Beobachtung, daß die Wachstumskurve der TbB in unseren Nährmedien weitgehend durch die Zahl der TbB beeinflußt wurde, die in dem verimpften Ausgangsmaterial vorhanden war. Stark positive Auswurfsproben gingen erheblich früher an und zeigten sowohl bei makroskopischer wie auch bei mikroskopischer Beobachtung ein sehr viel stärkeres Wachstum der hineingeimpften TbB als wir es in denjenigen Kulturen beobachten konnten, die wir nur mit wenigen TbB beimpft hatten.

Weiter sahen wir, daß der Kulminationspunkt des TbB-Wachstums schon relativ früher erreicht wurde, etwa in der 2., spätestens in der 3. Woche, so daß bei Beobachtung der Kulturen in der 3. oder 4. Woche makroskopisch wie auch mikroskopisch eine deutliche Verminderung des

TbB-Wachstums festgestellt werden konnte. Kulturen, die im allgemeinen nicht sehr stark positiv waren, waren nach Abschluß der Bebrütungsdauer (4 Wochen) dann oft schon mikroskopisch frei von TbB. Diese Beobachtung steht in guter Uebereinstimmung mit den interessanten Arbeiten von O. Bail über bakterielle Wachstumskurven (M-Konzentration) in flüssigen Nährböden. —

Wie schon von O. Kirchner und in Uebereinstimmung mit diesem von Rahim angegeben wurde, so wuchsen auch bei unseren Versuchen die TbB nicht auf der Oberfläche der Kulturflüssigkeit, sondern in der Tiefe der Nährböden, wobei allerdings nicht immer die TbB einzeln für sich lagen, sondern eine zopfähnliche oder fischzugähnliche Anordnung zeigten. — Für die Benutzung solcher Kulturen für die Prüfung von Desinfektionsmitteln oder von chemotherapeutisch wirksamen Präparaten dürfte diese Beobachtung nicht unwesentlich sein.

Beurteilt man die praktische Brauchbarkeit unserer Nährböden für den kulturellen TbB-Nachweis, so ergibt sich zunächst aus unseren Tabellen, daß besonders der Nährboden mit Detavit schon nach 8 -14 Tagen eine erhebliche Wachstumsvermehrung zeigte. Wenn man bedenkt, daß auf dem Eiernährboden das Angehen der Kulturen frühestens nach 3 Wochen, gar nicht so selten aber auch erst viel später mit bloßem Auge sichtbar wird, so dürfte sich daraus die praktisch-diagnostische Bedeutung unserer Befunde klar ergeben. Dabei sei noch daran erinnert, daß in unseren Nährböden das Angehen der Kulturen ja nicht nur mikroskopisch sondern auch makroskopisch einwandfrei festgestellt werden konnte, dieses freilich meist erst nach 14 Tagen.

Bemerkenswert sind wohl auch die kulturellen Ergebnisse bei den Auswurfproben, in denen nur ganz wenige TbB vorhanden waren, so daß sie nur fluorescenzmikroskopisch, nicht dagegen im Ziehl-Neelsen-Präparat, gefunden werden konnten. Gerade in dieser Versuchsreihe

bewährte sich unser Detavitnährboden recht gut, da schon in der ersten Woche von den 33 verarbeiteten Sputen bei 28 ein positives Ergebnis festzustellen war. Vergleichen wir damit die Züchtungsbefunde auf Eiernährböden (es sei hier erinnert an die Arbeit von W. Jung, der an einem reichlichen Material die fluorescenzmikroskopische Methode mit der Kultur auf Eiernährböden verglich), so glauben wir auf Grund unserer eigenen kulturellen Befunde sagen zu können, daß unser Detavitnährboden den Eiernährböden zumindest gleichwertig ist. Dasselbe gilt wohl auch für unseren Nährboden mit Zusatz von Mohrrübensaft, in dem neben dem Karotin vielleicht auch die wasserlöslichen Vitamine wirksam gewesen sein dürften. (Siehe hierzu die Arbeit von Abdul Rahim). —

Aus unserer letzten Versuchsreihe geht dann hervor, daß bei der Verarbeitung all der Auswurfproben, die weder im Ziehl-Neelsen-Präparat noch fluorescenzmikroskopisch TbB enthielten, auch kulturell ein Wachstum nicht zu beobachten war. Auch diese Befunde stehen in guter Uebereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeit von W. Jung. Wir dürften somit annehmen, daß wenn überhaupt in einer Auswurfprobe einzelne TbB vorhanden sind, daß sie dann sowohl fluorescenzmikroskopisch als auch kulturell, und zwar nicht nur auf den üblichen Eiernährböden, sondern auch in unseren vitaminhaltigen Nährlösungen nachgewiesen werden können.

Zusammenfassung.

1. In der Lockemann-Kirchnerschen Nährlösung wurde durch Zugabe von Kartoffelmehl und fettlöslichen Vitaminen ein gutes und schnelles Tiefenwachstum von Tuberkelbakterien erzielt. —
2. Von den benutzten vitaminhaltigen Nährböden bewährten sich am besten die Medien mit Detavit und Mohrrübensaft, während der Zusatz von Lebertran, Vogan und Vigantol zu weniger guten kulturellen Ergebnissen führte.
3. Auch bei der Verarbeitung von Auswurfproben, die nur vereinzelte, ausschließlich im Fluorescenzmikroskop nachweisbare Tuberkelbakterien enthielten, zeigten die Detavitkulturen ein schnelles, makroskopisch und mikroskopisch stark positives Wachstum.
4. Während bis zum Angehen von TbB-Kulturen auf Eiernährböden meist 3—4 Wochen vergehen, waren die vitaminhaltigen flüssigen Nährböden schon nach 8—14 Tagen deutlich positiv.
5. Wie auf anderen TbB-Spezialnährböden, so wuchsen auch auf den in dieser Arbeit beschriebenen synthetischen Vitaminnährböden bovine Tuberkelbakterien nicht so schnell und auch nicht so regelmäßig wie der Typus humanus.

Im Hinblick auf die von mir eingereichte Arbeit zur Promotion gestatte ich mir anschließend dem Vorstand des Hygienischen Instituts zu Berlin meinen Dank für die Erlaubnis, dort arbeiten zu dürfen, auszusprechen.

Ganz besonders bin ich Herrn Professor Pesch für seine liebenswürdige Unterstützung und Unterweisung zu Dank verpflichtet.

Literaturverzeichnis.

Bail: Ueber bakterielle Wachstumskurven. Köln 1938.

Hagemann, P.: Fluorescenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin. Münch. med. Wschr. 1938., Nr. 28, S. 1066.

Herrmann, W.: Dtsch. med. Wschr. 1937, Nr. 38, S. 1354.

Jung: Dissertation 1939. Berlin.

Kirchner, O.: Z. Bl. f. Bakteriolg.. 1932, Bd. I.

Koch, Robert: Mitteil. Kaiserl. Gesundheitsamt 2, Berlin 1884.

Lockemann: Dtsch. med. Wschr. 19/510/1919.

Petragnani: Boll.. Ist. sierater. milan. s. H. 3, 1926.

Petroff: S. A. Journ. Exper. med. vo. 21, 1915, p. 38.

Rahim Abdul: Dissertation 1939. Berlin.

Rheza-Nouir: Dissertation 1939. Berlin

Strehl: Dissertation 1939, Berlin.

Teubert: Dissertation 1939, Berlin.

Lebenslauf.

Ich, Marianne Auguste Meißner, geb. Jahn, bin am 2. 11. 1908 in Brandenburg/Havel geboren und habe dort zunächst das Städt. Lyzeum und Oberlyzeum, von Untersekunda ab das v. Saldernsche Realgymnasium besucht, an welchem ich im Jahre 1929 mein Abiturium ablegte. — Ostern 1929 ließ ich mich an der Friedrich-Wilhelms-Universität, Berlin für Medizin immatrikulieren und besuchte die Universität bis zum Jahre 1932. — Ich unterbrach mein Studium aus pekuniären Gründen 5 Jahre lang und bestand im Jahre 1937 mein Physikum an der Universität Berlin und legte an derselben Universität am 29. 8. 1940 mein ärztliches Staatsexamen ab.